



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Compuestos antibióticos con actividad fotocontrolada

Autor/es

CARLOS HERNANDO LOZA

Director/es

DIEGO SAMPEDRO RUIZ

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2016-17



Compuestos antibióticos con actividad fotocontrolada, de CARLOS
HERNANDO LOZA

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los
titulares del copyright.

© El autor, 2017

© Universidad de La Rioja, 2017

publicaciones.unirioja.es

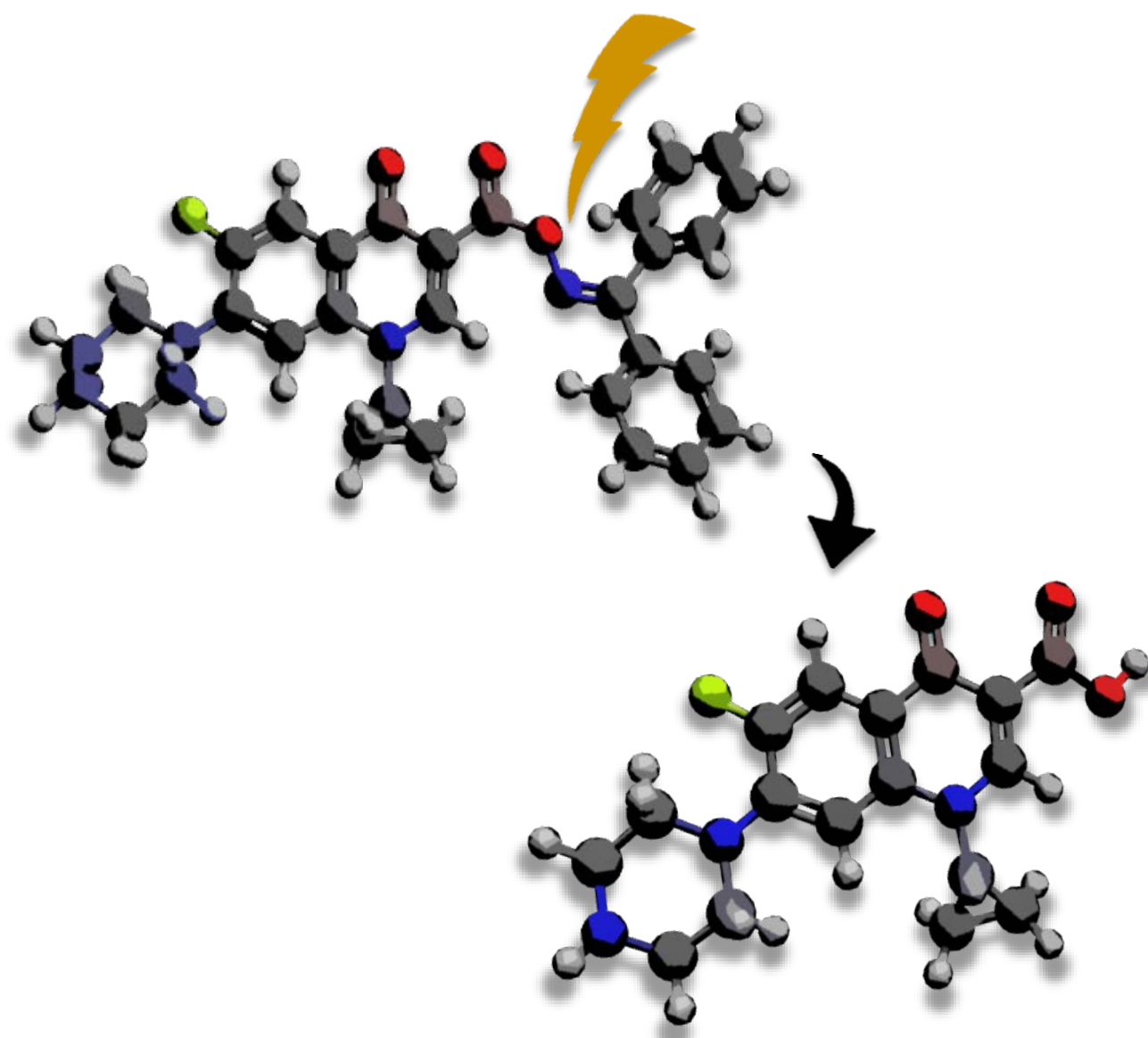
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Compuestos antibióticos con actividad fotocontrolada

Carlos Hernando Loza

GRUPO DE FOTOQUÍMICA ORGÁNICA

Tutor: Diego Sampedro Ruiz



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA

Trabajo de Fin de Grado – Grado en Química – Junio 2017

Tabla de Contenido

Abreviaciones	3
RESUMEN/Abstract	4
CAPÍTULO 1. Introducción	6
CAPÍTULO 2. Antecedentes	8
2.1. Ciprofloxacino	9
2.2. Interruptores moleculares	10
2.3. Fotoliberación de fármacos.....	11
2.4. Generación de radicales	12
2.5. Uso de sensibilizadores	13
CAPÍTULO 3. Objetivos	14
CAPÍTULO 4. Síntesis y estudio fotoquímico	16
PARTE A. Modificación de la planicidad del ciprofloxacino.	17
PARTE B. Modificación del grupo ácido del ciprofloxacino.....	22
PARTE C. Estudios fotoquímicos.....	24
i. Sensibilizadores inorgánicos.	24
ii. Sensibilizadores orgánicos	27
iii. Pruebas con acetona como disolvente	28
iv. Estimación de la energía del estado excitado (E_T)	33
CAPÍTULO 5. Conclusiones	37
CAPÍTULO 6. Parte experimental	39
PARTE A. Modificación de la planicidad del ciprofloxacino.	40
PARTE B. Modificación del grupo ácido del ciprofloxacino.....	40
Caracterización de compuestos	42
Anexos	43

Abreviaciones

ADN	ácido desoxirribonucleico
Anh.	anhidro
Ar	grupo aromático
ATP	adenosín trifosfato
Boc	<i>tert</i> -butil carbonato
Boc₂O	di- <i>tert</i> -butil dicarbonato
c	cuatriplete (en RMN)
°C	grados Celsius
¹³C RMN	resonancia magnética nuclear de ¹³ C
CCF	cromatografía de capa fina
δ	desplazamiento químico
d	doblete (en RMN)
DMF	dimetilformamida
dt	doblete de tripletes (RMN)
ESI(+)	electrospray con detección de ion positivo.
g	gramo
¹H RMN	resonancia magnética nuclear de ¹ H
h	hora
Hz	hercios
hν	luz, fotones, irradiación
J	constante de acoplamiento
L	litro
LED	Light emitting diode
M	molaridad (mol/L)
m	Multiplete (RMN)
Me	metilo
MeOH	metanol
mg	miligramos
MHz	megahercios
mL	mililitros
mmol	milimoles
MS	espectroscopía de masas
ppm	partes por millón
R	alquilo
R_f	factor de retención (CCF)
rt	room temperature
t	tiempo
THF	tetrahidrofurano
uma	unidades de masa atómica
UV	ultravioleta
Vis	visible
W	vatios

RESUMEN/Abstract

En este trabajo se estudia cómo modificar la estructura del ciprofloxacino, un agente antibiótico, para poder controlar su actividad fotoquímicamente al ser irradiado a una determinada longitud de onda.

Se siguen dos rutas de trabajo alternativas para este propósito: una primera de síntesis de un interruptor molecular fotoquímicamente activado y una segunda de liberación fotoquímica.

Se detallan tanto las síntesis de compuestos basados en el ciprofloxacino como los procesos fotoquímicos de isomerización y/o ruptura de enlace.

Por último, se muestran los datos de la caracterización y los espectros de los compuestos sintetizados.

This work studies how to modify the structure of ciprofloxacin, an antibacterial agent, so as to control its activity in a photochemical way, when irradiating with a certain wavelength.

Two working paths are considered: a photochemically-induced molecular switch, and alternatively, a photo-releasing method.

Both synthesis of ciprofloxacin-based-compounds and photochemical isomerization and bond-breaking-off processes are detailed below.

Finally, the characterization data and spectra of the synthesized compounds are shown.

CAPÍTULO 1.

Introducción

Llamamos fotoquímica a la rama de la química que estudia los efectos de la luz en las sustancias. Generalmente, el término se utiliza para describir la reacción química causada por la absorción de luz ultravioleta (de 100 a 400 nm), visible (400 – 700 nm) o infrarroja (750 – 2500 nm). En la naturaleza, la fotoquímica es de inmensa importancia y está presente en procesos como la fotosíntesis, la visión o la síntesis de vitamina D a partir de luz solar.¹

Las reacciones fotoquímicas se llevan a cabo de forma diferente a como lo hacen las reacciones convencionales – activadas térmicamente—. En una reacción fotoquímica, el reactivo absorbe un fotón de luz, alcanzando la energía de activación necesaria para generar intermedios de reacción muy energéticos, imposibles de generar térmicamente. Como ya se abordará más adelante, existen varios tipos de procesos fotoquímicos, algunos de ellos reversibles y otros responsables de reacciones en cadena.

Como aplicaciones que ofrece, cabe destacar el diseño y síntesis de motores y máquinas moleculares, premio Nobel de Química en 2016.

Por otro lado, la resistencia a los antibióticos es también un tema de actualidad. Las bacterias cada vez se vuelven más resistentes, incluso ya se han descubierto cepas de bacterias imposibles de combatir aún con los antibióticos más potentes conocidos. El mal uso de los antibióticos, así como el abuso de ellos hace que pierdan su eficacia, y que la ciencia no cese de buscar nuevas alternativas.

Un problema de los antibióticos es que, al ser transportados por vía sanguínea, son distribuidos por todo el cuerpo, y no sólo interactúan con los lugares activos de las bacterias, sino que también alteran el funcionamiento del propio organismo provocando efectos secundarios indeseados. Una posible solución, en la que están trabajando numerosos grupos de investigación, es la de “proteger” el compuesto y desprotegerlo al llegar al sitio indicado bien sea en contenedores o activándolo mediante alguna reacción química o fotoquímica.²

En este proyecto, se unen ambas partes con el fin de investigar las distintas posibilidades que las reacciones fotoquímicas ofrecen al control de la actividad de los antibióticos, activándose al ser irradiados por luz de una determinada longitud de onda, minimizando posibles efectos adversos y contribuyendo a un uso más eficiente de los mismos. Además, se contribuye así a disminuir la acumulación de antibióticos en el medio ambiente, con la multitud de consecuencias negativas que trae consigo.

¹ Glusac, K. (2016). *What has light ever done for chemistry?* (Doctoral dissertation, Nature Research).

² Mayer, G., & Heckel, A. (2006). Biologically active molecules with a “light switch”. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(30), 4900-4921.

CAPÍTULO 2.

Antecedentes

2.1. Ciprofloxacino

El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro de la familia de las fluoroquinolonas, que a su vez son un amplio grupo de antibióticos de origen sintético, es decir, no son producidos por microorganismos, y tienen una actividad antimicrobiana de toxicidad selectiva.

Es activo contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Fue descubierto en 1987 por Barry, A. L.; Fuch, P.C. y hoy en día es ampliamente utilizado para tratar infecciones severas de los sistemas urinario, respiratorio, gastrointestinal e incluso para el tratamiento de la tuberculosis.³

Su mecanismo de funcionamiento es inhibir la replicación del ADN, impidiendo por tanto la división celular.⁴ Tanto los grupos funcionales que posee como su estructura plana son esenciales para su actividad.

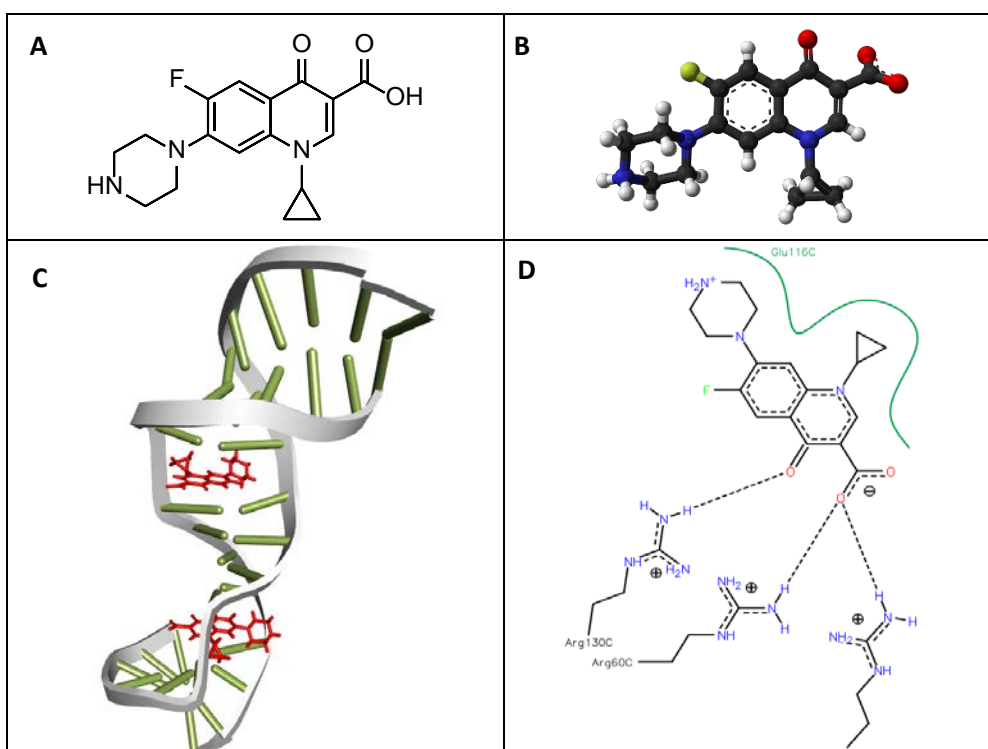


Figura 1. A y B. Estructuras del ciprofloxacino en 2D y 3D respectivamente. C. Inserción del ciprofloxacino en la doble hélice de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. D. Interacciones del ciprofloxacino con una proteína de *Salmonella enterica*. (Fuente: RCSB, PDB (5BTC; 4KRA))

³ Akhtar, R., Yousaf, M., Naqvi, S. A. R., Irfan, M., Zahoor, A. F., Hussain, A. I., & Chatha, S. A. S. (2016). Synthesis of ciprofloxacin-based compounds: A review. *Synthetic Communications*, 46(23), 1849-1879.

⁴ Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(3), 377-392.

No sólo puede introducirse entre las dos hebras de ADN [Figura 1C], sino que también interacciona con los sitios activos de ciertas enzimas (ADN girasa y topoisomerasas II y IV) involucradas en el proceso de replicación de ADN. El grupo ácido es imprescindible para estas interacciones [Figura 1D].

2.2. Interruptores moleculares

Un interruptor molecular es una molécula que puede ser intercambiado reversiblemente entre dos o más estados estables.⁵ El estímulo necesario para el cambio de estado puede ser el pH, la temperatura, una corriente eléctrica o la luz.

En este caso, el estímulo necesario para intercambiar los estados “encendido” o activo, y “apagado” o inactivo es la luz.

En los últimos años, se han desarrollado multitud de aplicaciones para los interruptores moleculares: controlar la forma de los cristales,⁶ ingeniería de proteínas,⁷ orientación de polímeros de cristales líquidos...⁸

Modificar la estructura del interruptor y por lo tanto las propiedades de los sistemas mediante la luz como estímulo externo tiene algunas ventajas:^{9,10}

- Determinadas longitudes de onda se pueden utilizar para minimizar los efectos perjudiciales de la luz en el sistema.
- Se obtiene un alto nivel de resolución espacial y temporal.
- No se obtienen productos secundarios o subproductos tras la absorción del fotón.

A pesar del gran número de aplicaciones prometedoras para los interruptores fotoquímicos, la mayoría de los compuestos utilizados tienen las mismas propiedades químicas. Se dividen a grandes rasgos en dos tipos, dependiendo del proceso fotoquímico que permite el intercambio entre ambas formas.

- Tipo I. Los compuestos pueden isomerizar entre dos formas: abierta y cerrada.
- Tipo II. Los compuestos isomerizan a través de un doble enlace, entre las formas *E/Z*.

⁵ Sauvage, J. P., & Amendola, V. (2001). *Molecular machines and motors* (Vol. 99). Springer Science & Business Media.

⁶ Bushuyev, O. S., Tomberg, A., Friščić, T., & Barrett, C. J. (2013). Shaping crystals with light: crystal-to-crystal isomerization and photomechanical effect in fluorinated azobenzenes. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34), 12556-12559.

⁷ Ritterson, R. S., Kuchenbecker, K. M., Michalik, M., & Kortemme, T. (2013). Design of a photoswitchable cadherin. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34), 12516-12519.

⁸ Bogdanov, A., Bobrovsky, A., Ryabchun, A., & Vorobiev, A. (2012). Laser-induced holographic light scattering in a liquid-crystalline azobenzene-containing polymer. *Physical Review E*, 85(1), 011704.

⁹ Balzani, V., Credi, A., & Venturi, M. (2008). *Molecular devices and machines: concepts and perspectives for the nanoworld*. John Wiley & Sons.

¹⁰ Martínez-López, D., Yu, M. L., García-Iriepa, C., Campos, P. J., Frutos, L. M., Golen, J. A., ... & Sampedro, D. (2015). Hydantoin-Based Molecular Photoswitches. *The Journal of organic chemistry*, 80(8), 3929-3939.

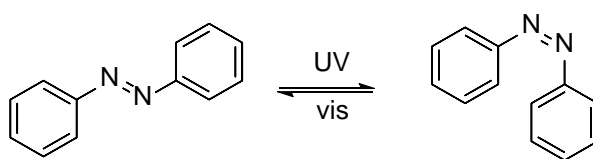


Figura 2. Ejemplo de un interruptor molecular de tipo II biestable basado en el azobenceno¹¹

2.3. Fotoliberación de fármacos.

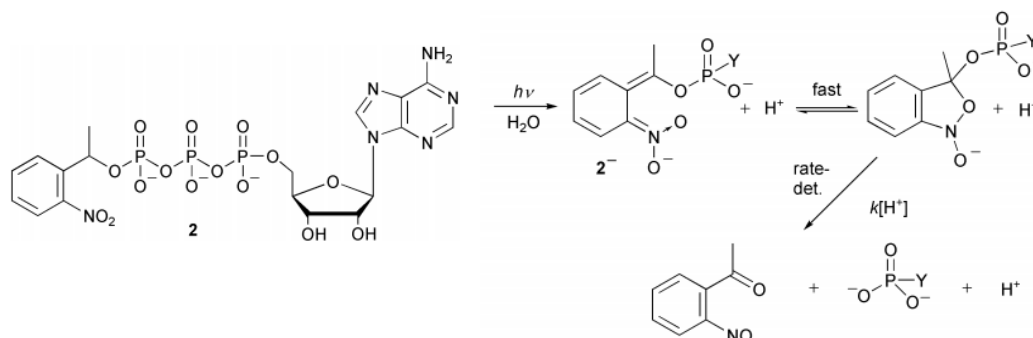
La fotoliberación¹¹ de moléculas, *photo-release* o *caged moléculas*—moléculas “enjauladas”— es una técnica acuñada a finales de los años 70.¹² Puede dar lugar a confusiones, ya que inevitablemente puede sugerir el encapsulamiento de moléculas en jaulas como tal, como el caso del C₆₀. No es tal el caso, y algunos autores se refieren a ello como *light-activated molecules*.

De cualquier manera, la fotoliberación implica una activación irreversible de una molécula mediante luz, quitando el grupo fotolábil.

Idealmente, cabe esperar que este tipo de moléculas sean solubles en agua, la jaula –molécula junto con el grupo fotolábil— sea estable a la hidrólisis, que la desprotección fotoquímica ocurra con un alto rendimiento cuántico y a longitudes de onda no demasiado cortas (>300 nm), y que los subproductos no sean tóxicos.¹³

La primera molécula fotoactivable fue un derivado del ATP, y el mecanismo de reacción¹⁴ se muestra a continuación:

Esquema 1. Ejemplo de molécula fotoactivable.



¹¹ Mayer, G., & Heckel, A. (2006). Biologically active molecules with a “light switch”. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(30), 4900-4921.

¹² Kaplan, J. H., Forbush III, B., & Hoffman, J. F. (1978). Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium: potassium pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry*, 17(10), 1929-1935.

¹³ Givens, R. S., Weber, J. F., Jung, A. H., & Park, C. H. (1998). [1] New photoprotecting groups: Desyl and p-hydroxyphenacyl phosphate and carboxylate esters. *Methods in enzymology*, 291, 1-29.

¹⁴ Pelliccioli, A. P., & Wirz, J. (2002). Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochemical & photobiological sciences*, 1(7), 441-458.

2.4. Generación de radicales

Un radical, también llamado radical libre, es una especie química – en este caso orgánica— caracterizada por tener uno o más electrones desapareados. Se forman como intermedios de reacciones químicas, a partir de la ruptura homolítica de una molécula, y en general es extremadamente inestable –y con gran poder reactivo— y de vida media muy corta.¹⁵

Los radicales poseen existencia independiente aunque tengan vidas medias muy breves, por lo que se pueden sintetizar en el laboratorio, se pueden formar en la atmósfera por radiación, y también se forman en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno y actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN.¹⁶

Los radicales tienen una configuración electrónica de capas abiertas por lo que llevan al menos un electrón desapareado que es muy susceptible de crear un enlace con otro átomo o átomos de una molécula. Desempeñan una función importante en la combustión, en la polimerización, en la atmósfera, dentro de las células y en otros procesos químicos.

Vamos a considerar la generación fotoquímica de radicales, como se ve en la siguiente figura.

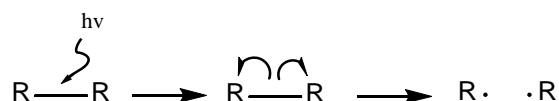


Figura 3. Mecanismo de generación fotoquímica de un radical.

Los radicales se pueden recombinar entre sí para dar un enlace, [Figura 4]

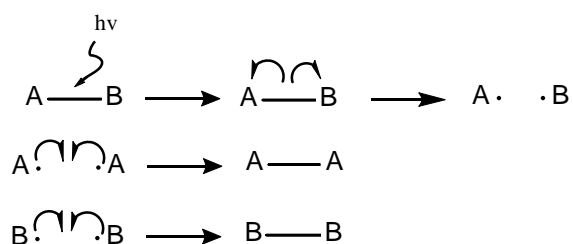


Figura 4. Recombinaciones radicalarias.

Los radicales iminílicos, generados fotoquímicamente a partir de aciloximas, experimentan casos de recombinación en los que se adicionan a sistemas insaturados.¹⁷ Esa capacidad de formación de enlaces se utiliza para generar anillos de cinco o seis miembros. [Figura 5]

¹⁵ IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

¹⁶ Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: Generation and chemical implications. *Chemical reviews*, 116(5), 3029-3085.

¹⁷ Alonso, R., Campos, P. J., Rodríguez, M. A., & Sampedro, D. (2008). Photocyclization of iminyl radicals: Theoretical study and photochemical aspects. *The Journal of organic chemistry*, 73(6), 2234-2239.

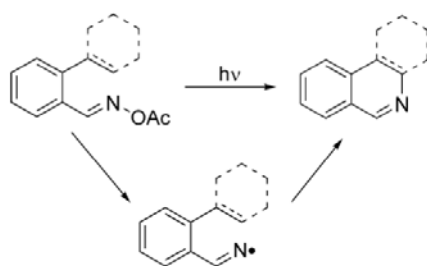


Figura 5. Formación de anillos a partir de acetatos de oxima.

2.5. Uso de sensibilizadores

Un sensibilizador es una sustancia capaz de ceder su energía de excitación, fundamentalmente por colisiones con otras moléculas. Así, aunque un compuesto no absorba a una determinada longitud de onda, puede excitarse si se le añade un sensibilizador que sí absorba y que transfiera energía.¹⁸

La elección de un sensibilizador adecuado es difícil:

- La energía de excitación del compuesto que se quiere estudiar y la del sensibilizador deben ser del mismo orden, o por lo menos, menor que la del sensibilizador [Figura 6].
- Debe ser capaz de transmitir esta energía en cantidades catalíticas con relación al compuesto a estudiar.
- Idealmente no debe reaccionar con los demás componentes de la muestra, ni en su estado fundamental ni en el excitado.

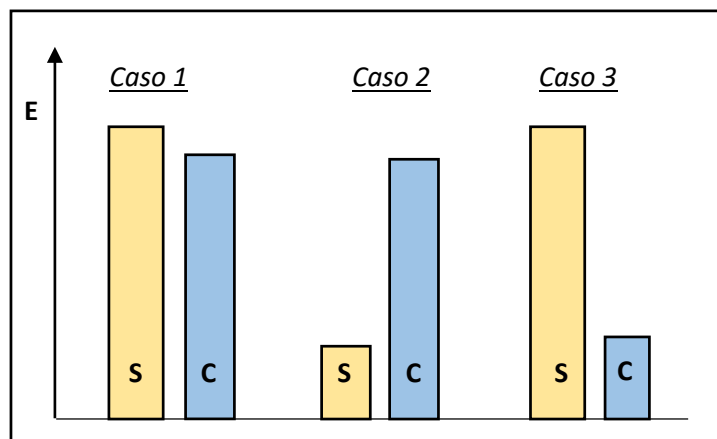


Figura 6. Energías de excitación de diferentes sensibilizadores (S) frente a un compuesto (C). Para el caso 1 la reacción se lleva a cabo, en el caso 2 no; en el caso 3 podría o no llevarse a cabo.

¹⁸ IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

CAPÍTULO 3.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- Llevar a cabo rutas de síntesis de derivados del ciprofloxacino con propiedades fotomodulables, teniendo en cuenta su reactividad y sus grupos funcionales, de manera que permitan la liberación *in situ* de la molécula.
- Estudiar el comportamiento fotoquímico y caracterizar los compuestos sintetizados, y finalmente evaluar su comportamiento frente a diferentes sensibilizadores fotoquímicos.

CAPÍTULO 4.

Síntesis y estudio fotoquímico

Como ya se ha visto, las propiedades antibióticas del ciprofloxacino van muy ligadas a su estructura, por lo que una simple modificación en ésta, compromete en gran medida su actividad.

PARTE A. Modificación de la planicidad del ciprofloxacino.

Una primera ruta de trabajo planteada ha sido el modificar la estructura plana de la molécula de ciprofloxacino, de modo que no pueda introducirse entre las hebras de ADN de las bacterias. [Figura 1C].

Para ello, se plantea la síntesis de un interruptor molecular, con una estructura de cromóforo como las mostradas a continuación:¹⁹

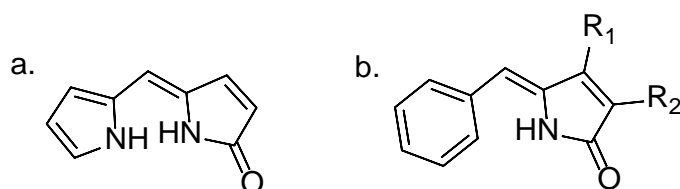
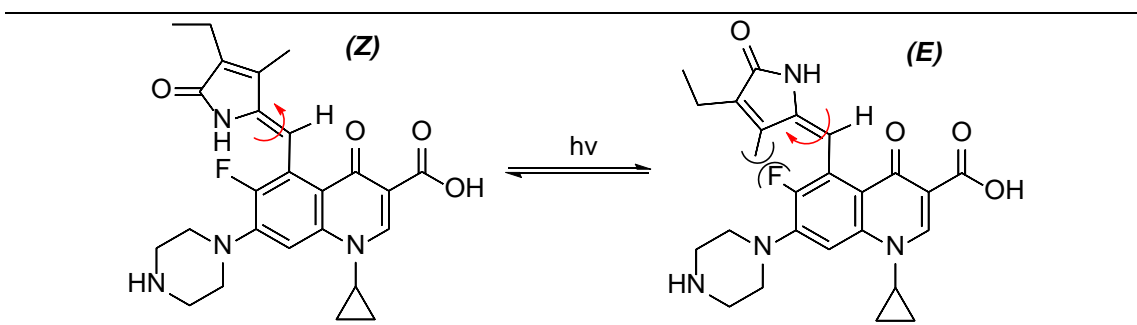


Figura 7. Posibles estructuras de cromóforos. Derivados de (a) dipirirrona y (b) benzalpirrolinona

La idea es sintetizar una molécula de este tipo, que al ser irradiada el doble enlace del grupo cromóforo isomerice, cambiando de configuración *E/Z*. Se produce una mayor repulsión y se altera la planicidad de la molécula.

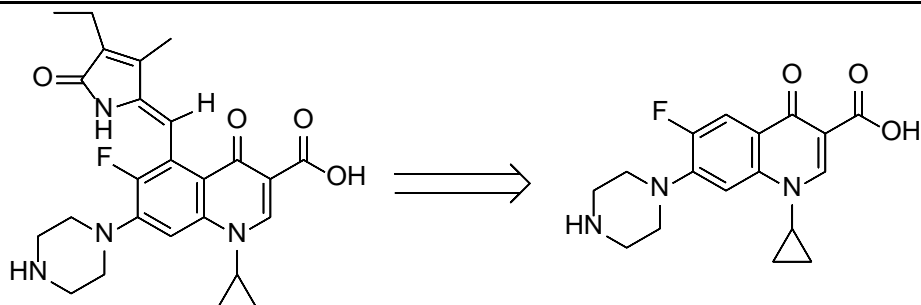
Esquema 2. Se observa el impedimento estérico en el confórmero *E*.



¹⁹ García-Iriepe, C., Ernst, H. A., Liang, Y., Unterreiner, A. N., Frutos, L. M., & Sampedro, D. (2016). Study of Model Systems for Bilirubin and Bilin Chromophores: Determination and Modification of Thermal and Photochemical Properties. *The Journal of Organic Chemistry*, 81(15), 6292-6302.

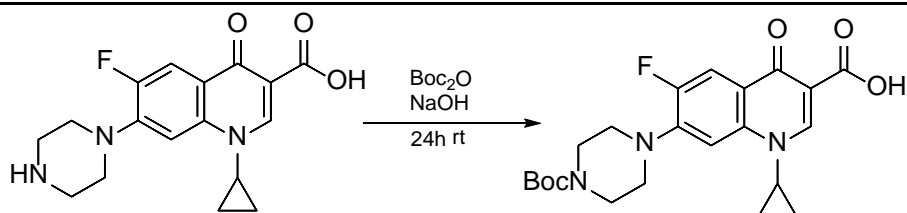
El esquema retrosintético se muestra a continuación:

Esquema 3.



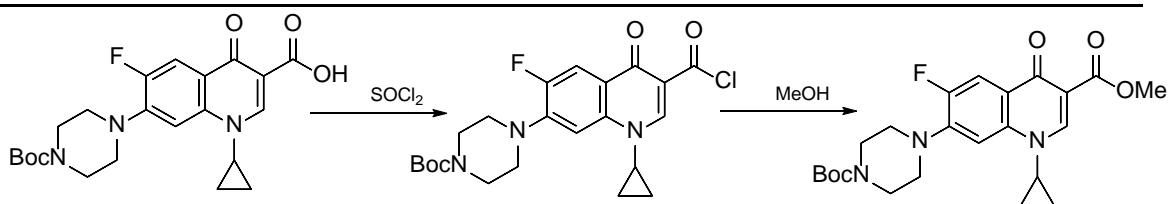
El primer paso de reacción es la protección de los grupos funcionales susceptibles de reaccionar del ciprofloxacino: el grupo ácido y el grupo amino. La amina se protege con el grupo protector Boc.

Esquema 4. Protección del grupo amino.



Para la protección del grupo ácido, se esterifica con metanol. Se forma primero el derivado clorado del ácido para mejorar el rendimiento de la esterificación.

Esquema 5. Procedimiento seguido para la esterificación del ácido.



Una vez protegido el ciprofloxacino por ambos grupos funcionales problemáticos, podemos seguir con la estrategia sintética. El siguiente paso es formar un aldehído para poder unir el grupo cromóforo, por lo que se llevará a cabo una formilación aromática, idealmente en la posición (a) [Figura 8] por estar menos impedida. Se prueba con diferentes alternativas con algunas modificaciones:

- Reacción de Vilsmeier-Hack.
- Reacción de Gatterman-Koch.
- Reacción de Reimer-Tiemann.
- Formilación con SnCl_4 , AlCl_3

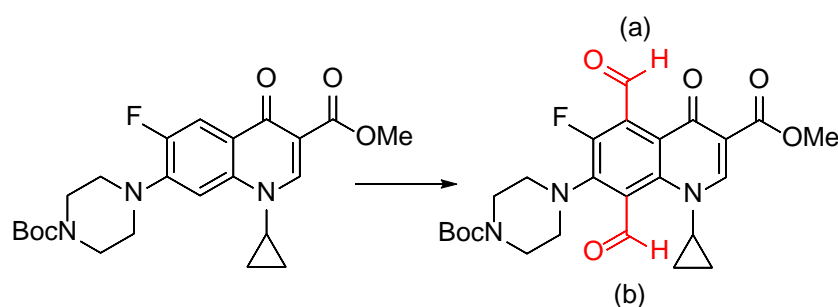
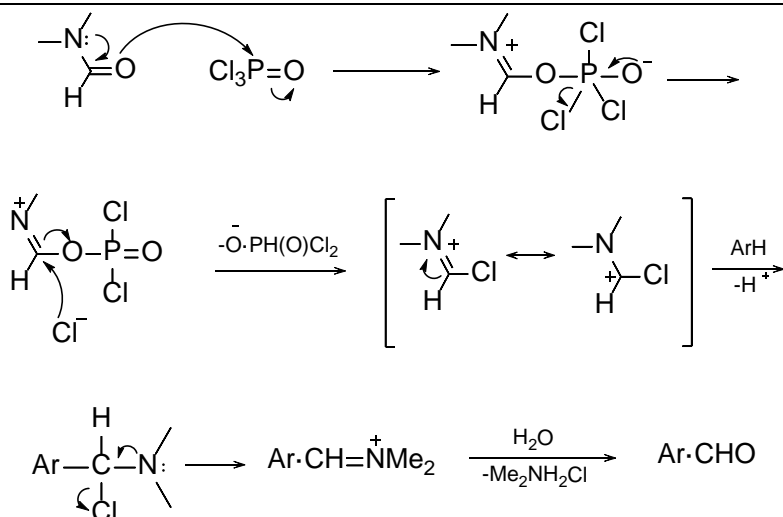


Figura 8. Formilación aromática esperada. Ambas opciones pueden ser útiles. Se observa que la posición (a) está menos impedida.

Reacción de Vilsmeier Hack

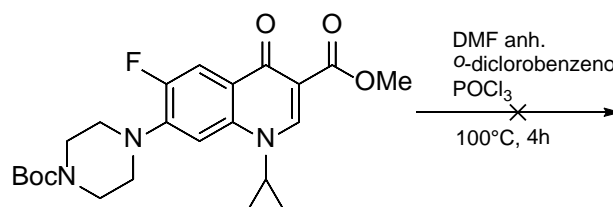
Ciertos hidrocarburos aromáticos reactivos pueden ser formilados por la dimetilformamida (DMF) en presencia de oxicloruro de fósforo. Este método puede resultar efectivo para la formilación de sistemas heteroaromáticos con exceso de densidad π .²⁰ A continuación se muestra el mecanismo general de la reacción²⁰ de Vilsmeier-Hack

Esquema 6. Mecanismo general de la reacción de Vilsmeier-Hack



El proceso se sigue mediante CCF y MS-ESI. No se produce reacción.

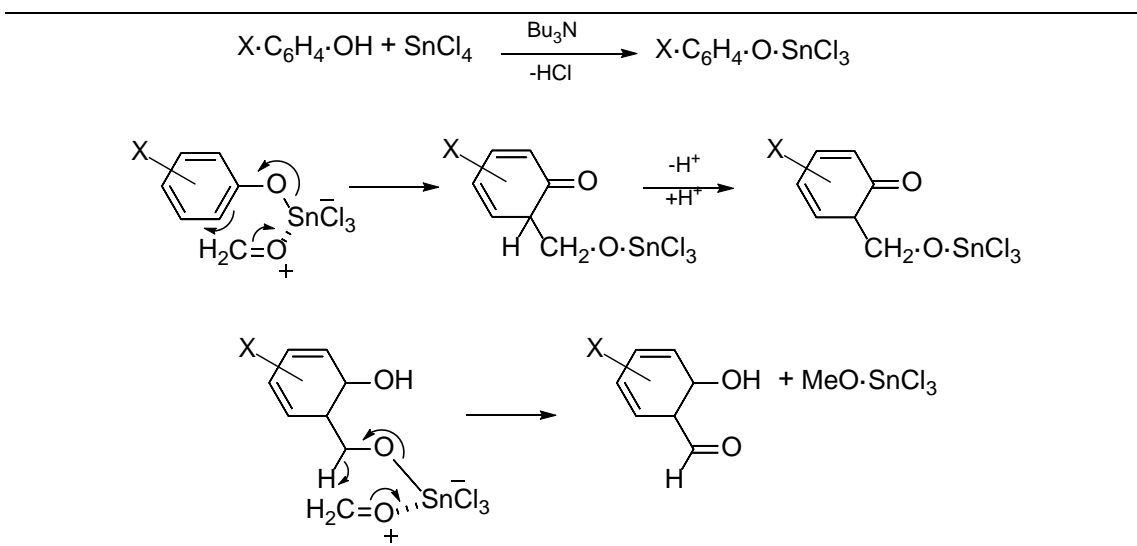
Esquema 7. Condiciones experimentales.



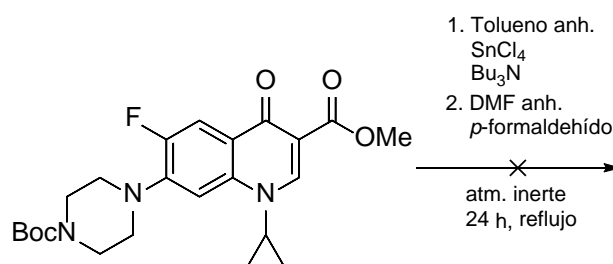
²⁰ Furniss, B. S., & Vogel, A. I. (1989). *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. Pearson Education India.(págs. 990-1)

Formilación con cloruro de estaño (IV)

Este método es aplicable a fenoles con grupos dadores y aceptores de electrones. El mecanismo de reacción transcurre a través de complejos de estaño en presencia de paraformaldehído:²¹

Esquema 8.

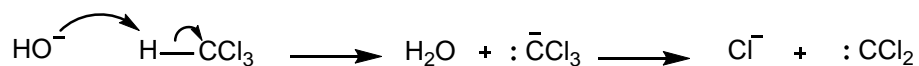
Se sigue mediante MS-ESI y CCF. La reacción esperada no se lleva a cabo. También se prueba con AlCl_3 como ácido de Lewis, aunque de nuevo sin éxito.

Esquema 9. Condiciones experimentales.

²¹ Furniss, B. S., & Vogel, A. I. (1989). *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. Pearson Education India.(págs. 992-3)

Reacción de Reimer-Tiemann

En esta reacción, al tratar el cloroformo en medio básico se forma como producto intermedio un diclorocarbano, que como especie deficiente en electrones, puede realizar una sustitución electrófila aromática en anillos con suficiente densidad electrónica.



Sin embargo, para el caso de un anillo aromático polisustituido como el caso del ciprofloxacino, y que además cuenta con grupos atractores de densidad electrónica, la reacción no se lleva a cabo.

En ninguno de las anteriores vías utilizadas para la formilación se obtiene el producto deseado. Dado que son reacciones con un alto rendimiento para sustitución electrófila en anillos aromáticos, se puede concluir que para el caso del ciprofloxacino el anillo aromático está muy desactivado debido a los grupos atrayentes de densidad electrónica como el flúor y el carbonilo.

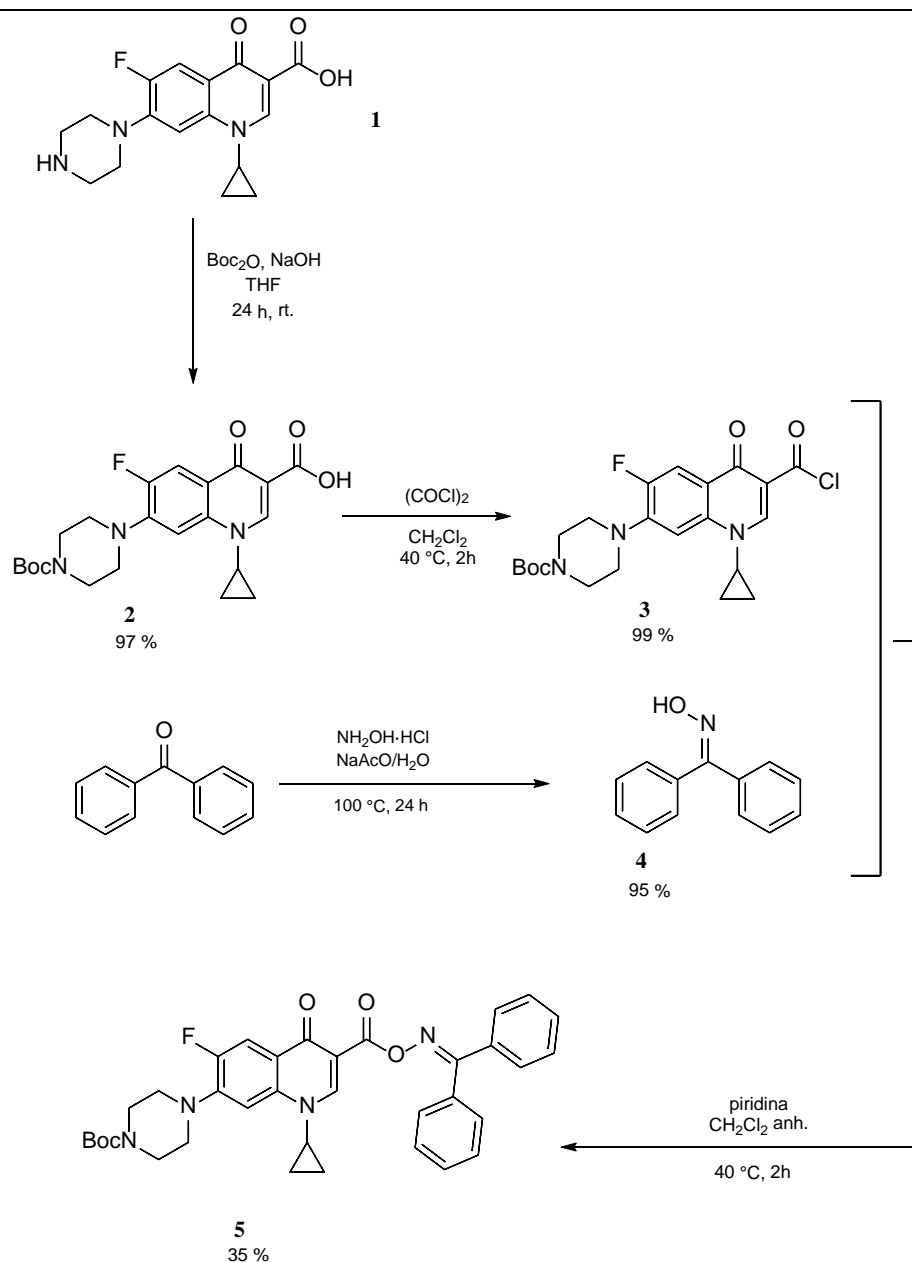
Por tanto, se desestima esta ruta de trabajo y se trabaja en la modificación del grupo ácido del ciprofloxacino.

PARTE B. Modificación del grupo ácido del ciprofloxacino.

Es sabido que, además de por su estructura plana, el grupo ácido es fundamental en su acción antibiótica. [Figura 1D]. Por lo tanto, si se bloquea el grupo ácido, el compuesto pierde su actividad antibiótica. Se sigue el principio de la fotoliberación de moléculas, anteriormente descrito.

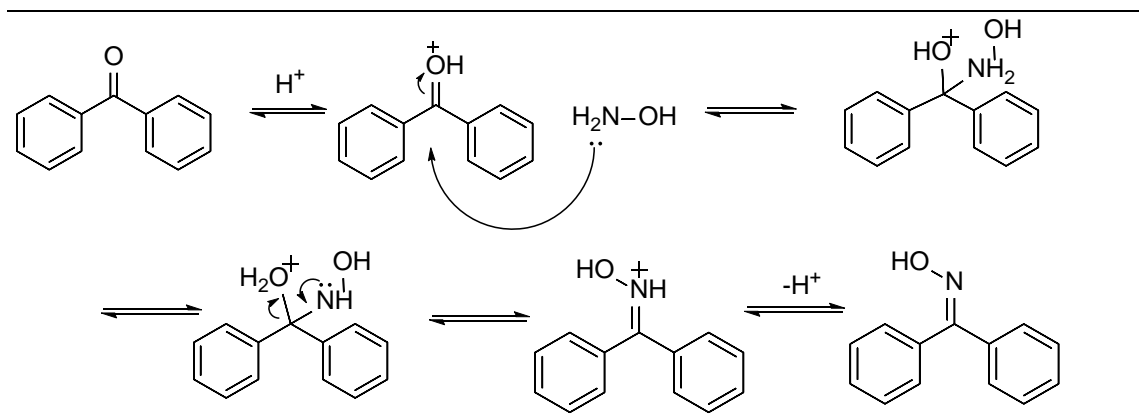
La idea consiste en transformar el grupo ácido en un éster de oxima, al cual, al irradiar con luz de una determinada longitud de onda se rompe el enlace éster de oxima quedando el ácido y la oxima libres.

Esquema 10. Procedimiento de reacción seguido.



Se comienza por la reacción de síntesis de la oxima a partir de benzofenona e hidroxilamina, cuyo mecanismo es el siguiente:

Esquema 11.



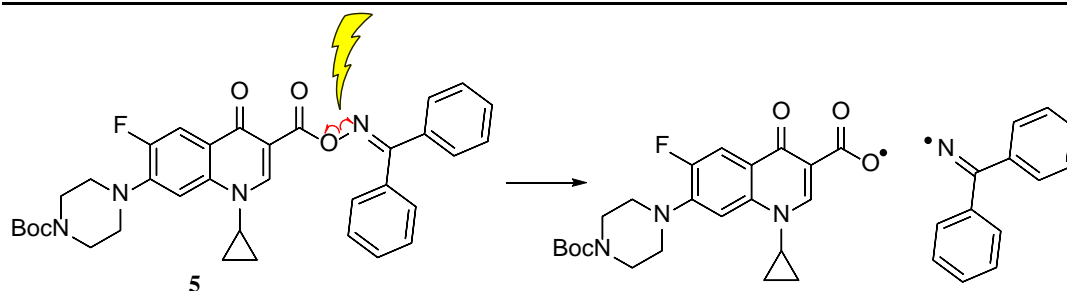
Por otro lado, se genera el cloruro de acilo correspondiente al ciprofloxacino para posteriormente formar la oxima.

El producto se purifica mediante cromatografía de columna.

PARTE C. Estudios fotoquímicos

Anteriores estudios avalan que el enlace O—N de un éster de oxima se rompe al ser irradiado a ciertas longitudes de onda.^{22,23} Por tanto, una vez obtenido **5**, se llevan a cabo los estudios fotoquímicos con el fin de romper dicho enlace y generar ciprofloxacino libre en el medio de reacción.

Esquema 12. Reacción fotoquímica esperada.



El enlace se rompe homolíticamente, dando lugar a dos radicales: el radical derivado del ciprofloxacino y el radical iminílico.

El compuesto **5** no absorbe en el visible, por lo que se utilizan diversos sensibilizadores que sí que absorben y que, como ya se ha visto anteriormente, transfieren su energía de excitación.

i. Sensibilizadores inorgánicos.

En un primer experimento se prueba con dos sensibilizadores inorgánicos que absorben en la región del visible [Figura 9].

- Tris (2,2'-bipyridyl) diclororutenio (II) hexahidrato
- Tris [2-fenilpiridinato – C2, N] iridio (II)

Tabla 1. Energías de triplete para los sensibilizadores inorgánicos utilizados.

	E_T (kcal/mol)
Ru(bpy)₃	48.0 ²²
Ir(ppy)₃	55.8 ²⁴

²² Martínez-López, D., Blanco-Lomas, M., Campos, P. J., & Sampedro, D. (2015). Visible light sensitized isomerization of rhodopsin-based molecular switches. *Tetrahedron Letters*, 56(15), 1991-1993.

²³ Ruiz, R. A. (2008). *Irradiación de aciloximas y su participación en procesos de ciclación intramolecular* (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja).

²⁴ Bansal, A. K., Penzkofer, A., Holzer, W., & Tsuboi, T. (2007). Photodynamics of OLED triplet emitters Ir (ppy)₃ and PtOEP. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 467(1), 21-31.

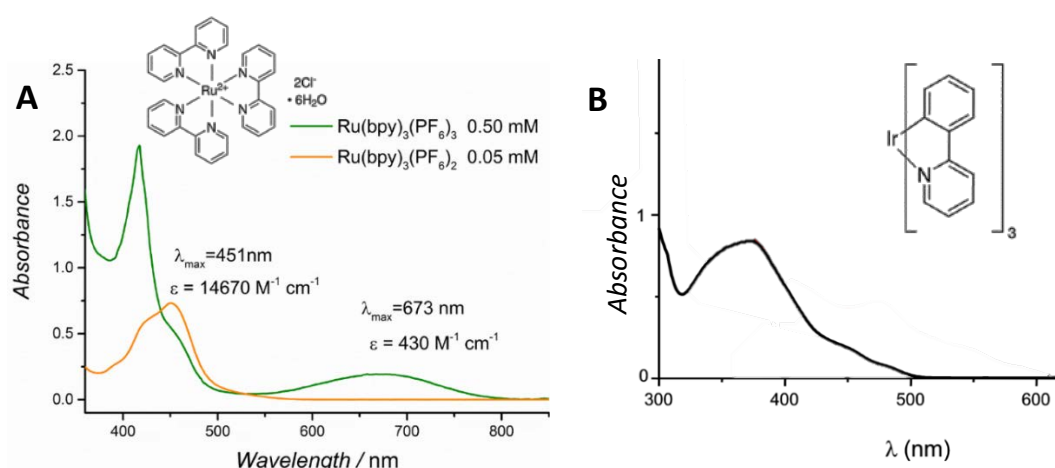


Figura 9. Espectros de absorción UV-Vis de A. $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ ²⁵ y B. $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ ²⁶

Para irradiar las muestras, se preparan 3 tubos de RMN en CDCl_3 :

1. Patrón. Sólo contiene el éster de oxima (compuesto **5**).
2. Contiene el éster de oxima + 2% molar de sensibilizador de Rutenio.
3. Contiene el éster de oxima + 2% molar de sensibilizador de Iridio.

Se comienza irradiando las 3 muestras con LED verde (máximo de emisión a 513 nm). La liberación del ciprofloxacino se analiza mediante RMN, esperándose ver dos juegos de señales y la aparición de la señal del ácido, en caso de que se viese.

Se sigue también mediante espectroscopía de masas.

Tras 12 h no se observa ningún cambio, por lo que se irradia en el LED azul, (máximo de emisión a 454 nm), más energético. Tras 12 h siguen sin observarse cambios.

Aunque los sensibilizadores utilizados sí que absorben en el visible, puede que su energía de excitación sea menor que la necesaria para excitar al éster de oxima, o puede que no la transfiera correctamente.

Se observa [Figura 11] que para el sensibilizador de complejo de iridio, se produce una gran cantidad de subproductos, aunque parece que la señal del ciprofloxacino es algo más alta que en los demás, no es significativo como para sacar conclusiones.

Para el caso del rutenio, no hay ninguna diferencia con el patrón.

²⁵ Hidalgo-Acosta, J. C., Méndez, M. A., Scanlon, M. D., Vrubel, H., Amstutz, V., Adamiak, W., ... & Girault, H. H. (2015). Catalysis of water oxidation in acetonitrile by iridium oxide nanoparticles. *Chemical Science*, 6(3), 1761-1769.

²⁶ Lalevée, J., Telitel, S., Xiao, P., Lepeltier, M., Dumur, F., Morlet-Savary, F., ... & Fouassier, J. P. (2014). Metal and metal-free photocatalysts: mechanistic approach and application as photoinitiators of photopolymerization. *Beilstein journal of organic chemistry*, 10(1), 863-876.

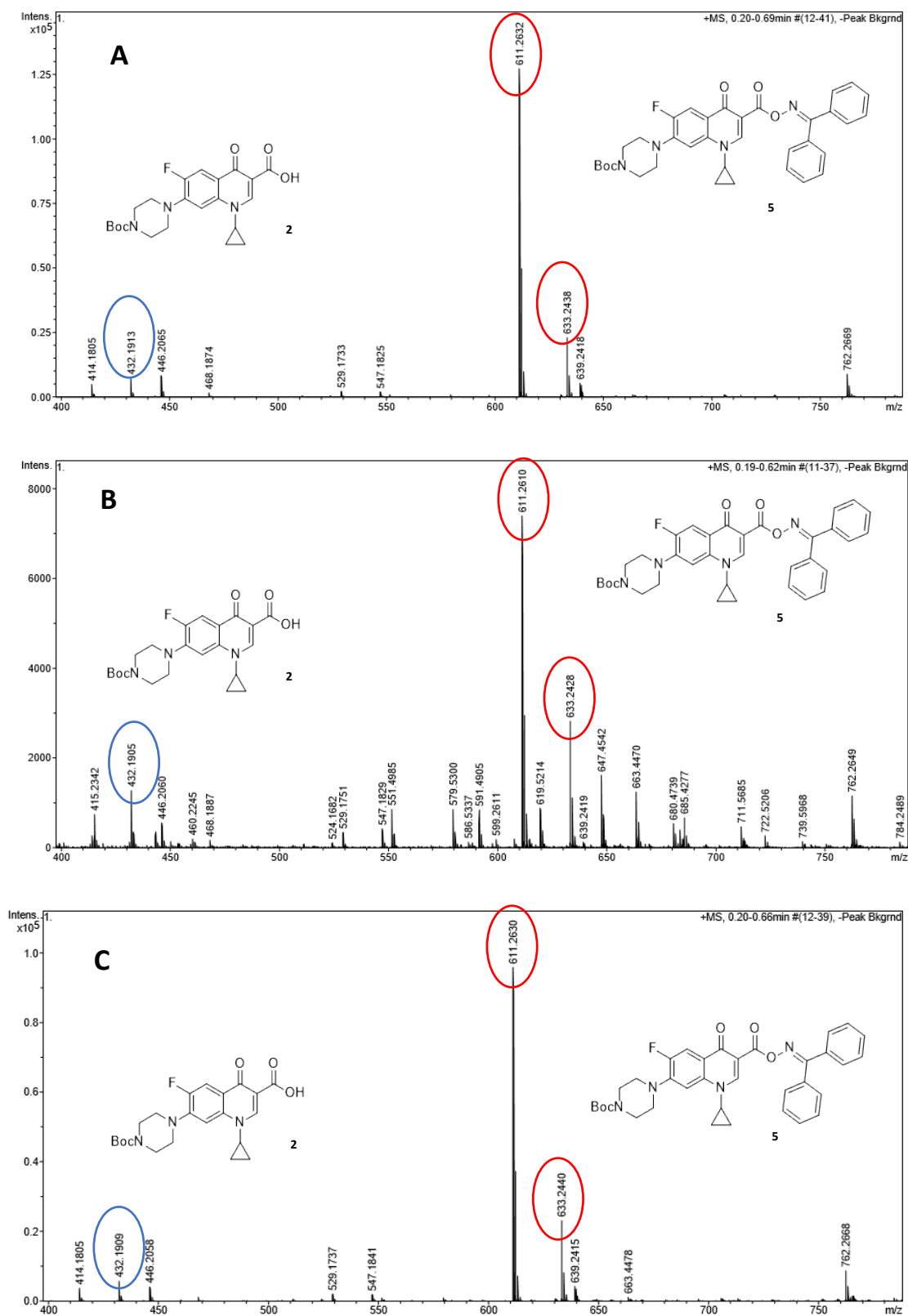


Figura 10. Espectroscopía de masas. 12 h de irradiación en LED azul. ESI (+). En rojo el compuesto 5, protonado (611,12) y sodiado (633,24). En azul compuesto 2 (432,19). (A) Patrón. (B) Con complejo de Iridio. (C) Con complejo de Rutenio.

ii. Sensibilizadores orgánicos

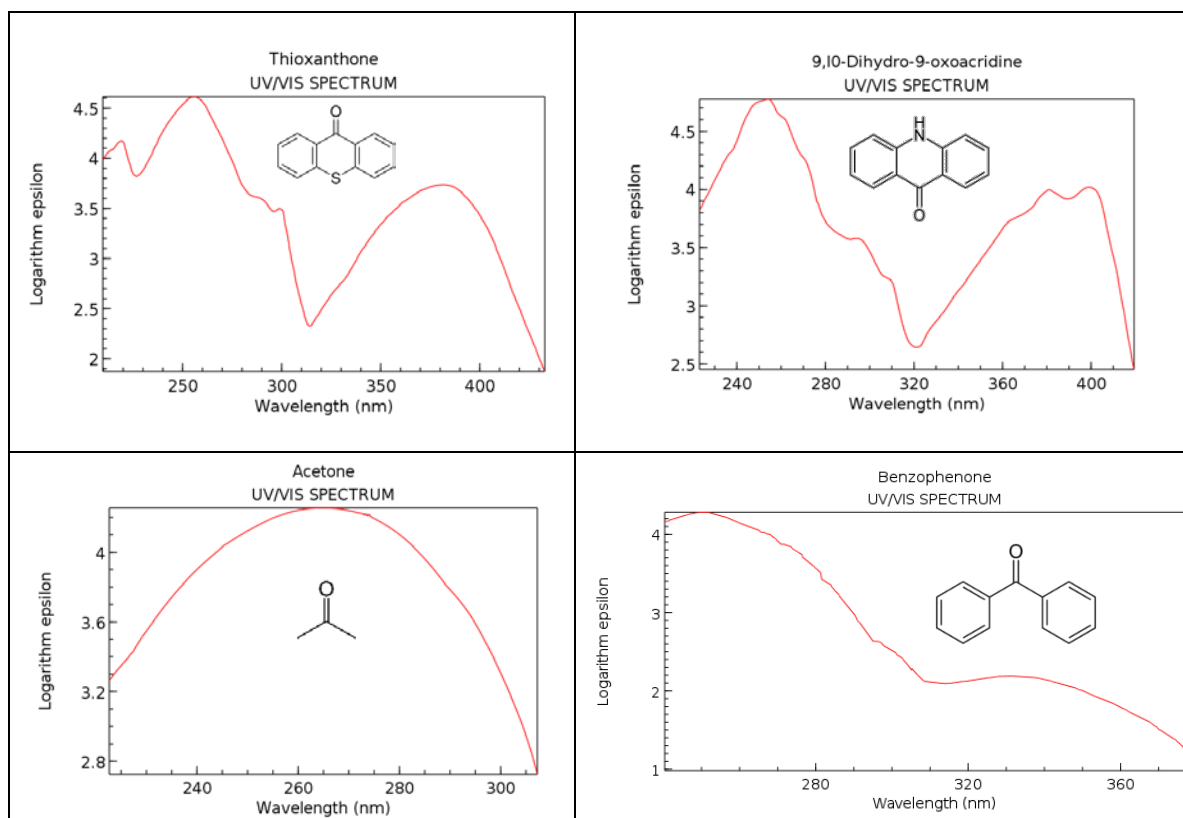


Figura 11. Espectros UV-Vis de los diferentes sensibilizadores orgánicos utilizados. (Fuente: NIST)

Tabla 2. Energías de triplete para los sensibilizadores orgánicos utilizados.²⁷

	E_T (kcal/mol)
Acridona	53.5
Tioxantona	63.3
Benzofenona	68.6
Acetona	79.4

Se preparan nuevamente 3 tubos de RMN, en CDCl_3 :

1. Patrón.
2. Patrón + tioxantona.
3. Patrón + acridona.

Se irradian en LED azul, 6 h.

No se obtiene la ruptura del enlace O—N esperada.

²⁷ Murov, S. L., Carmichael, I., & Hug, G. L. (1993). Handbook of photochemistry. CRC Press.

iii. Pruebas con acetona como disolvente

Se realiza el espectro de absorción UV-Vis en acetona del compuesto 5.

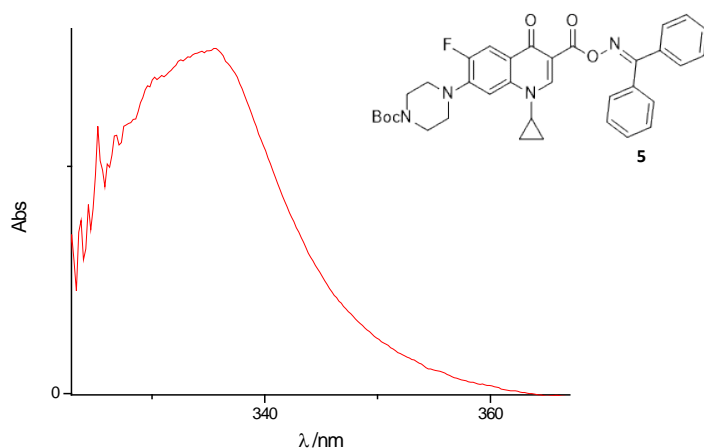


Figura 12. Espectro de absorción UV del compuesto 5 en acetona.

Observando el espectro de absorción de la acetona [Figura 11] se podría pensar que irradiando a 300 nm absorban tanto la acetona como el éster de oxima.

Sin embargo, a las condiciones de trabajo ($5 \cdot 10^{-5}$ M) usando acetona como disolvente, la absorción de radiación por parte del éster de oxima se considera nula. Por tanto, al realizar este experimento, si se produce la ruptura del enlace, se asume que es debida a la transferencia de energía por parte de la acetona.

Las condiciones del experimento son:

Se utiliza monocromador a longitud de onda fija (300 nm), y se va controlando el progreso mediante espectroscopía de masas, cada 30 minutos. La muestra se introduce en cubeta de cuarzo. Se utiliza acetona como disolvente. Los resultados se muestran a continuación.

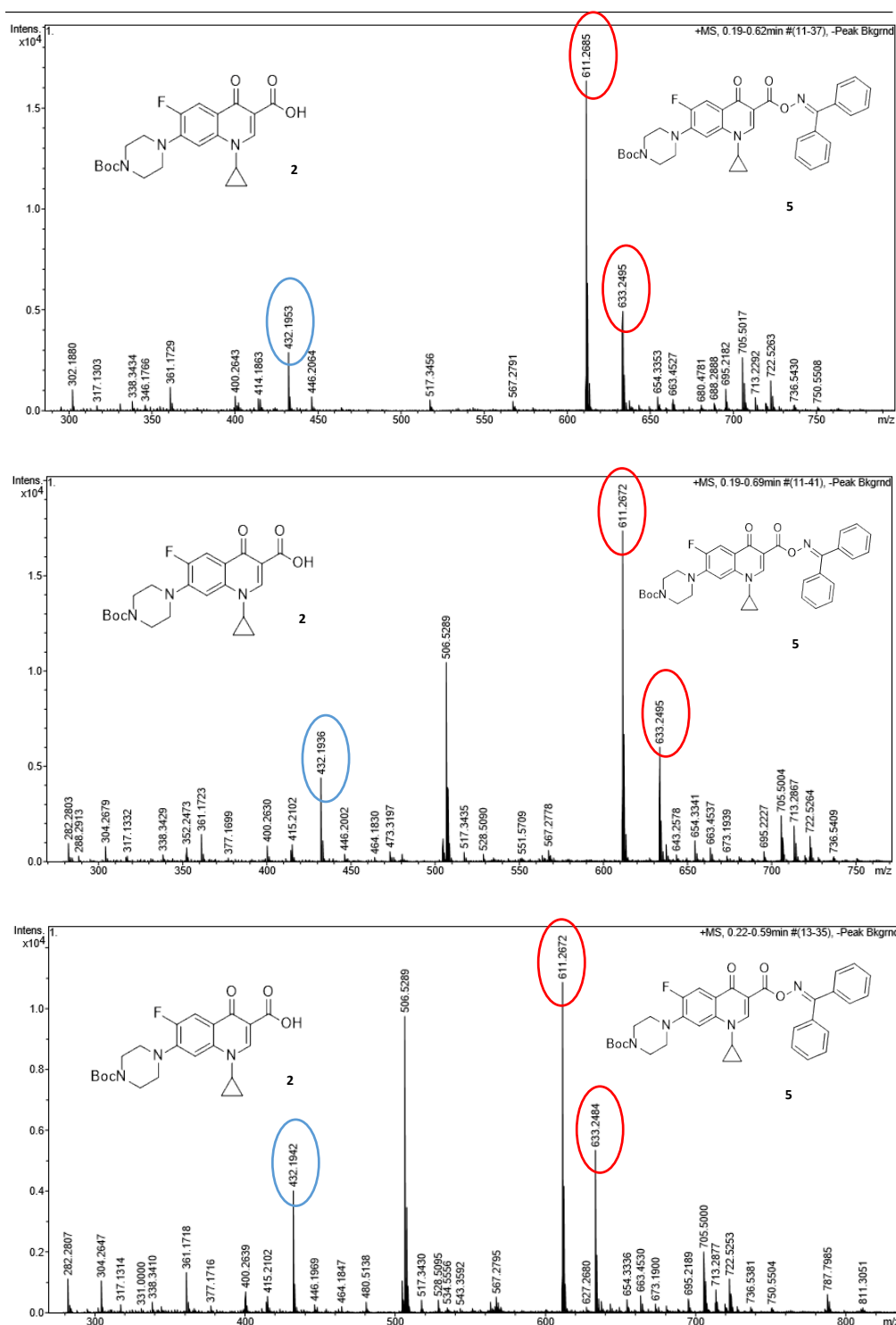


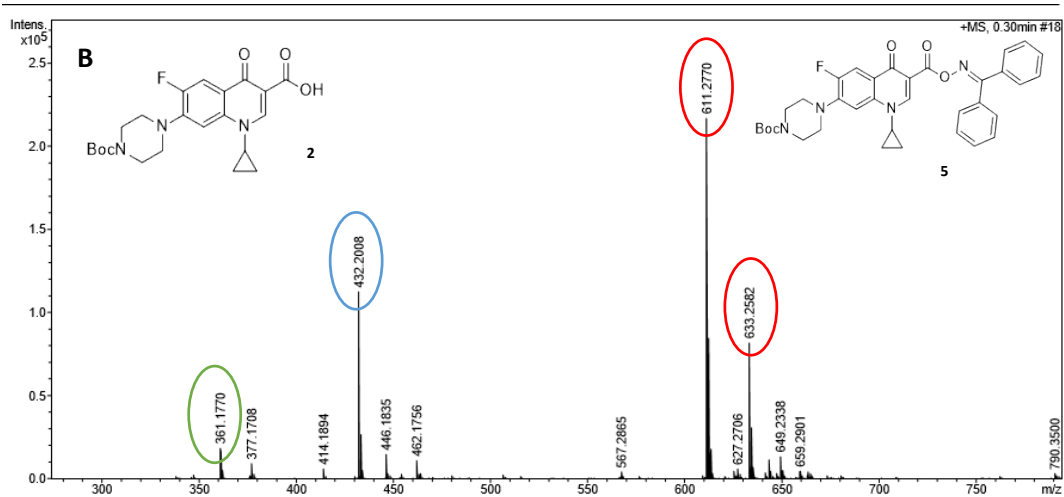
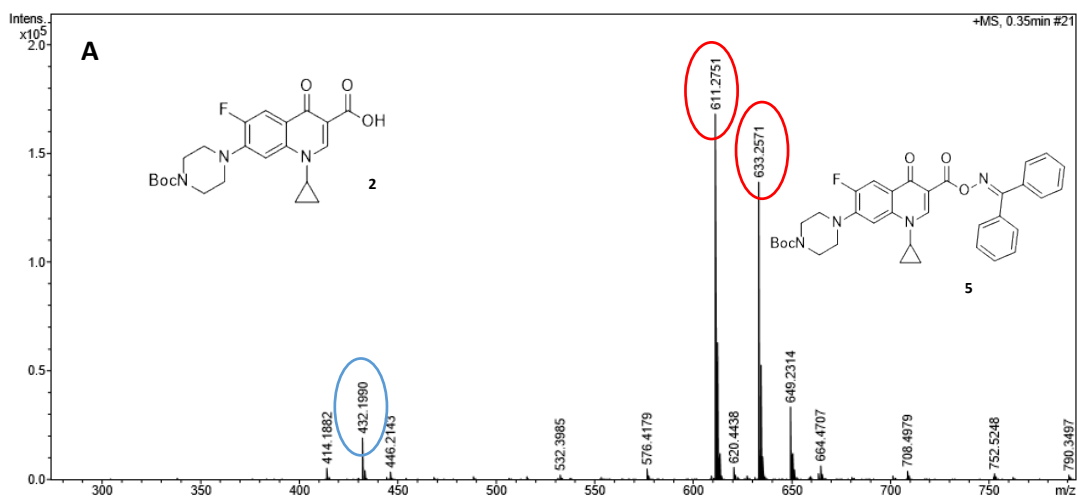
Figura 13. Espectroscopía de masas a t_0 (A), t_{30} (B) y t_{60} (C). Tiempo en minutos. En rojo: compuesto 5. En azul: compuesto 2. Obsérvese la formación de un subproducto a 506,52.

Tras una hora de irradiación, se observa que efectivamente el compuesto 5 se escinde para dar el compuesto 2 y otras impurezas.

Aunque no se rompe lo suficiente: aún queda mucho compuesto sin reaccionar.

Se lleva a cabo otro experimento, cuyas condiciones son:

- Se utiliza un reactor fotoquímico en lugar de monocromador (mucho mayor intensidad).
- Se utilizan lámparas de UVB (máx. a 300nm)
- Se utiliza un tubo de RMN con acetona deuterada como disolvente.
- La concentración es del orden de 10^{-5} M
- Se utilizan 4 lámparas de 8W.
- Se toman medidas cada 5 minutos.
- Se sigue el progreso mediante espectroscopía de masas.



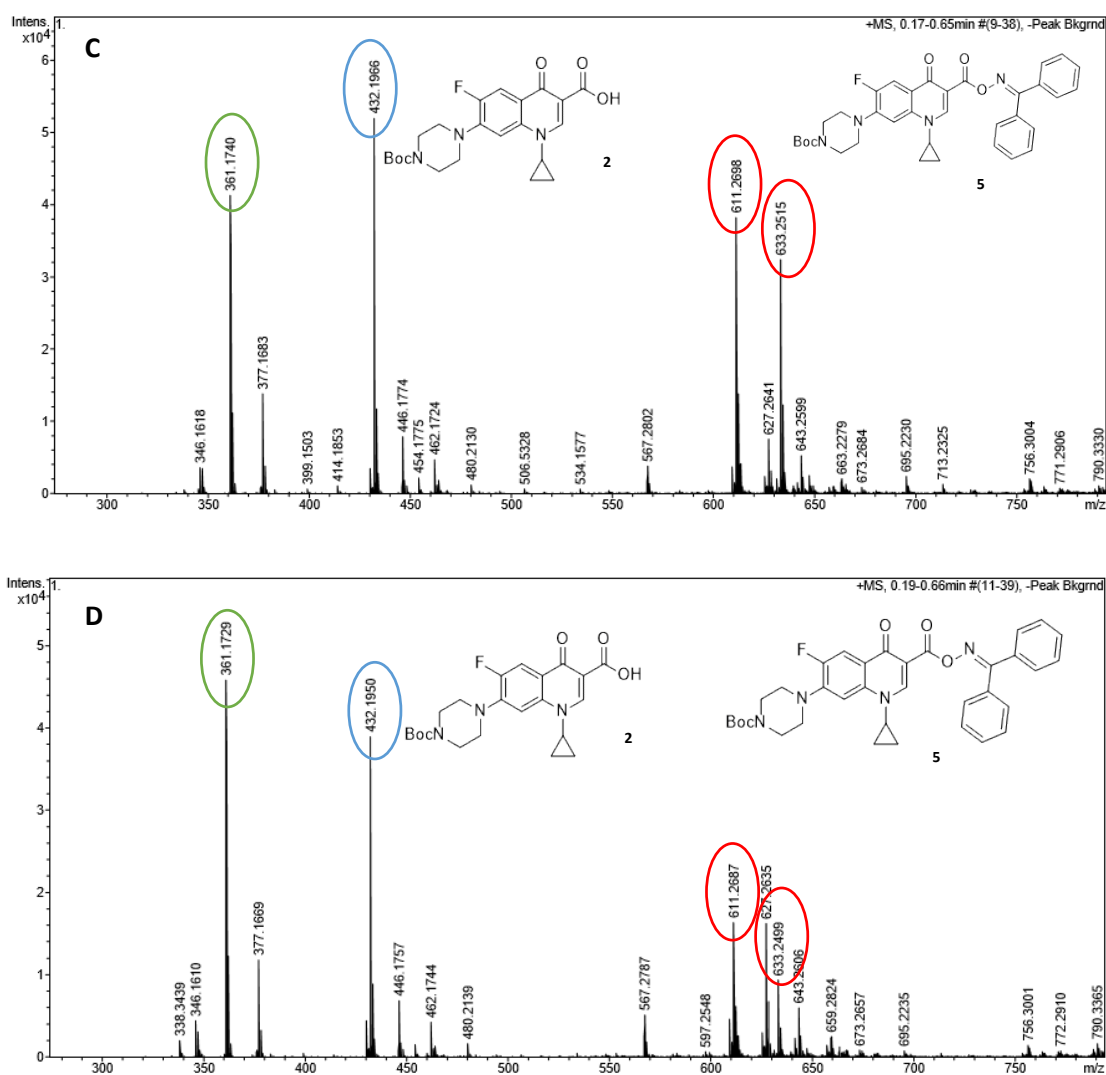


Figura 14. Espectroscopía de masas, a t_0 (A), t_5 (B), t_{15} (C) y t_{30} (D). Tiempo en minutos. En rojo: compuesto **5**. En azul: compuesto **2**. Subproducto a 361,17 en verde.

Se observa la formación de un subproducto de masa 360,16 a tiempos más largos, que podría generarse bien a partir de **5** o bien a partir de **2**. Para descartar una de las dos posibilidades, se diseña un experimento en el cual se irradia el compuesto **2** en las mismas condiciones.

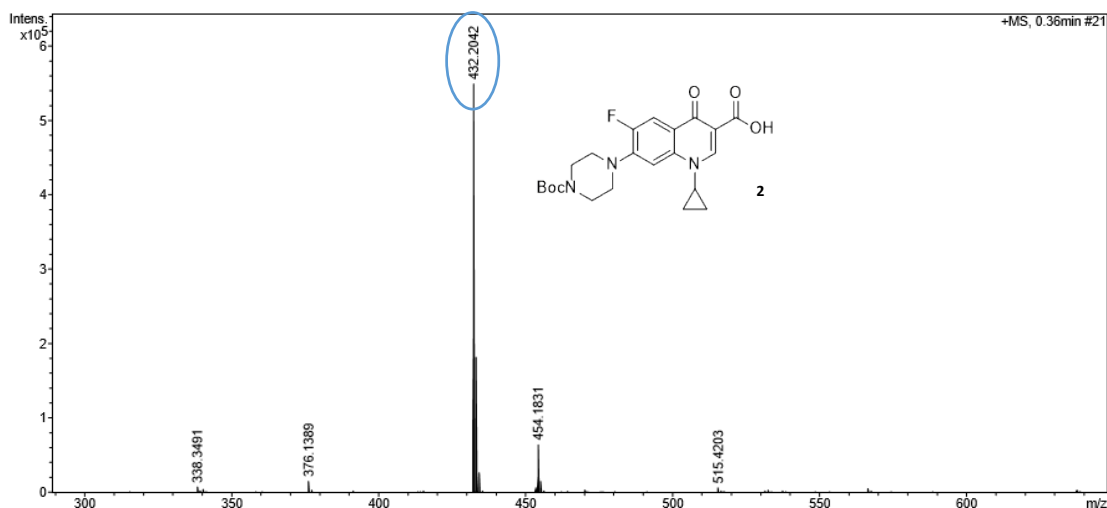
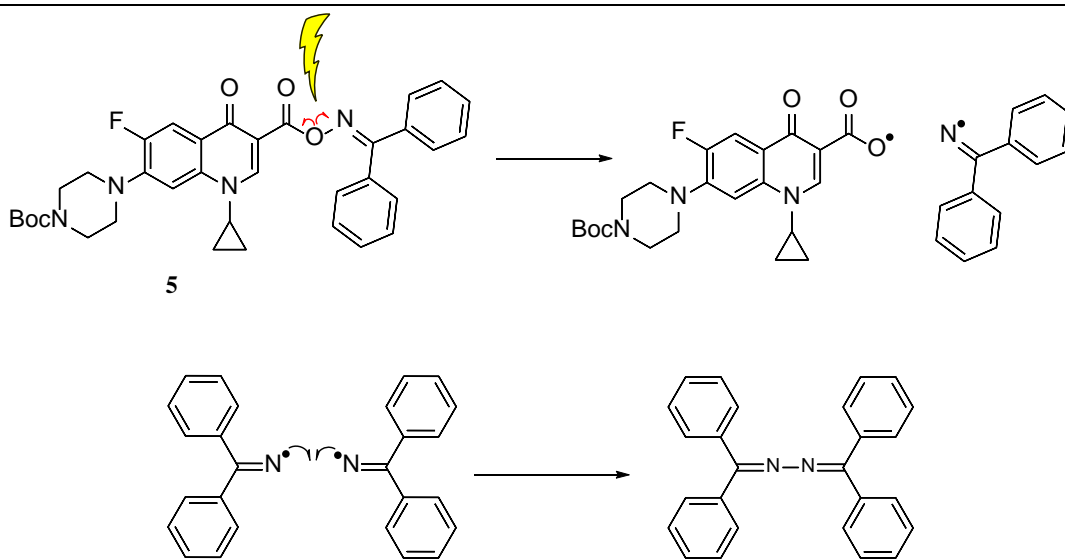


Figura 15. Espectro de masas resultante de irradiar **2** durante 30 minutos.

Observando la Figura 13, el compuesto **2** no descompone al ser irradiado a 300 nm con acetona como solvente. Por tanto, el producto a 361,17 no se origina a partir de **5**.

Se plantea por tanto la hipótesis de una recombinación radicalaria:

Esquema 13.



Para comprobar que efectivamente se trata de la combinación de los dos radicales iminio, se realiza un análisis de masa exacta mediante espectroscopía de masas.

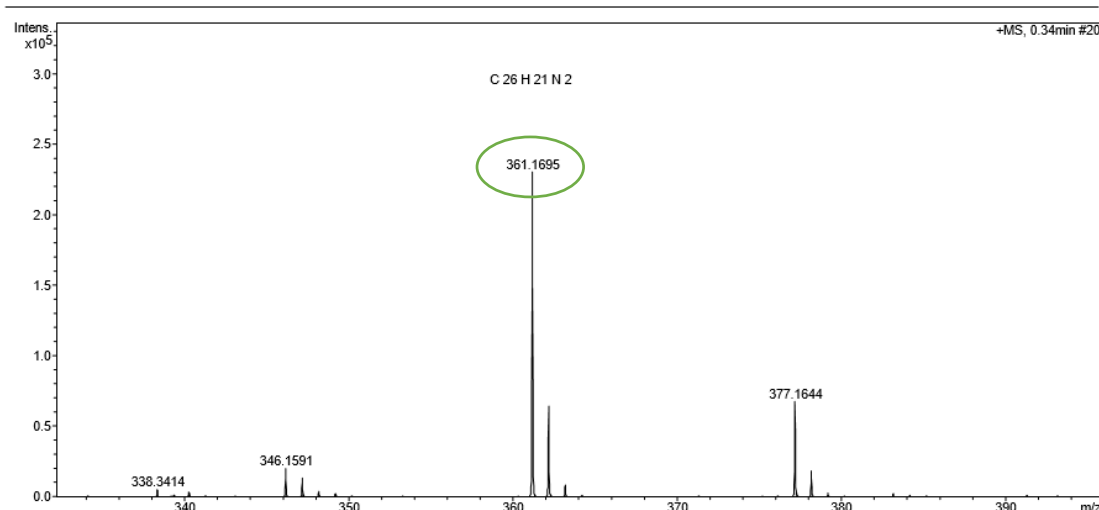


Figura 16. Análisis de masa exacta para el producto de masa 360,17.

Mediante un análisis de masa exacta [Figura 16] se confirma que la masa coincide con la del subproducto. Sin embargo, sería necesario purificar este producto para realizar ^1H RMN y/o ^{13}C RMN y verificar si efectivamente se trata de la molécula propuesta o no.

Concluimos por tanto hasta aquí que el compuesto **5** adquiere la energía necesaria para romper el enlace éster oxima debido a la acetona, que actúa como sensibilizador en esas condiciones.

iv. Estimación de la energía del estado excitado (E_T)

Ya que en acetona sí que se lleva a cabo la reacción [Tabla 2] ($E_T = 79,4$ kcal/mol) y en tioxantona no, ($E_T = 63,3$ kcal/mol) podemos suponer que la energía de excitación del compuesto **5** se encuentra entre ambos valores.

Para acotar más el valor, se realiza otro experimento con benzofenona como sensibilizador, en acetonitrilo como solvente, en una proporción 20:1 molar, en monocromador, irradiando a 340 nm (ver espectro absorción de benzofenona y comparar con el del compuesto **5**) siguiendo mediante masas la reacción cada 15 minutos.

Los resultados se muestran a continuación:

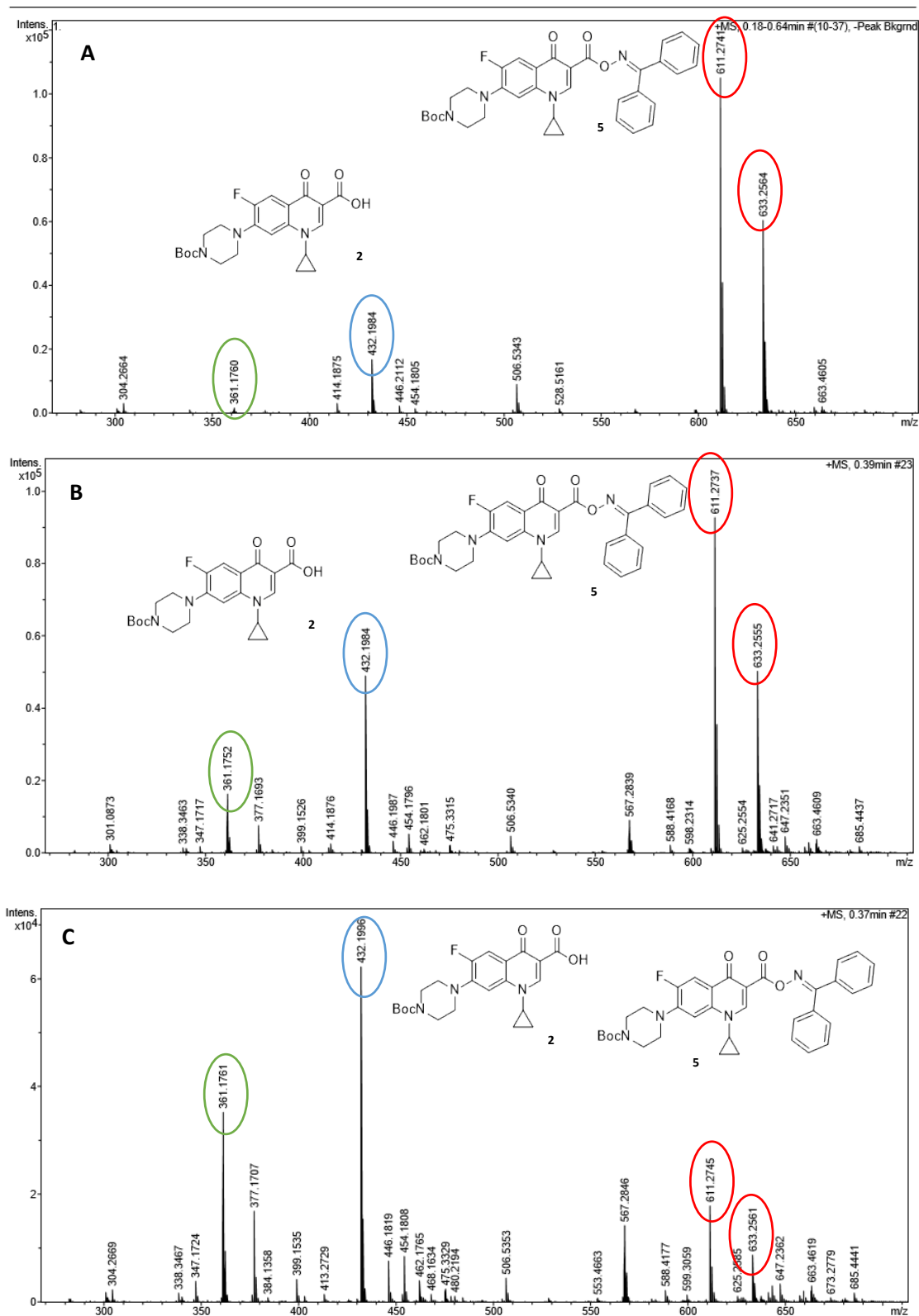


Figura 17. Espectroscopía de masas, a t_0 (A), t_{15} (B) y t_{60} (C) Tiempo en minutos. En rojo: compuesto 5. En azul: compuesto 2. Subproducto a 361,17 en verde.

Se concluye por lo tanto [Figura 17] que la reacción se lleva a cabo en estas condiciones, con benzofenona como sensibilizador.

El compuesto **5** absorbe hasta 360 nm, [Figura 12] así que a la longitud de onda a la que se ha llevado este experimento sí que ha podido absorber. Por esta razón, aunque el sensibilizador se encuentra en una proporción 20 veces mayor, probablemente hayan absorbido ambos compuestos.

Para descartar por completo que absorbe **5**, se realiza un último experimento en monocromador, irradiando a 370 nm, donde **5** ya no absorbe, utilizando de nuevo benzofenona como sensibilizador –ya que esta sí que absorbe–.

Los resultados se muestran a continuación:

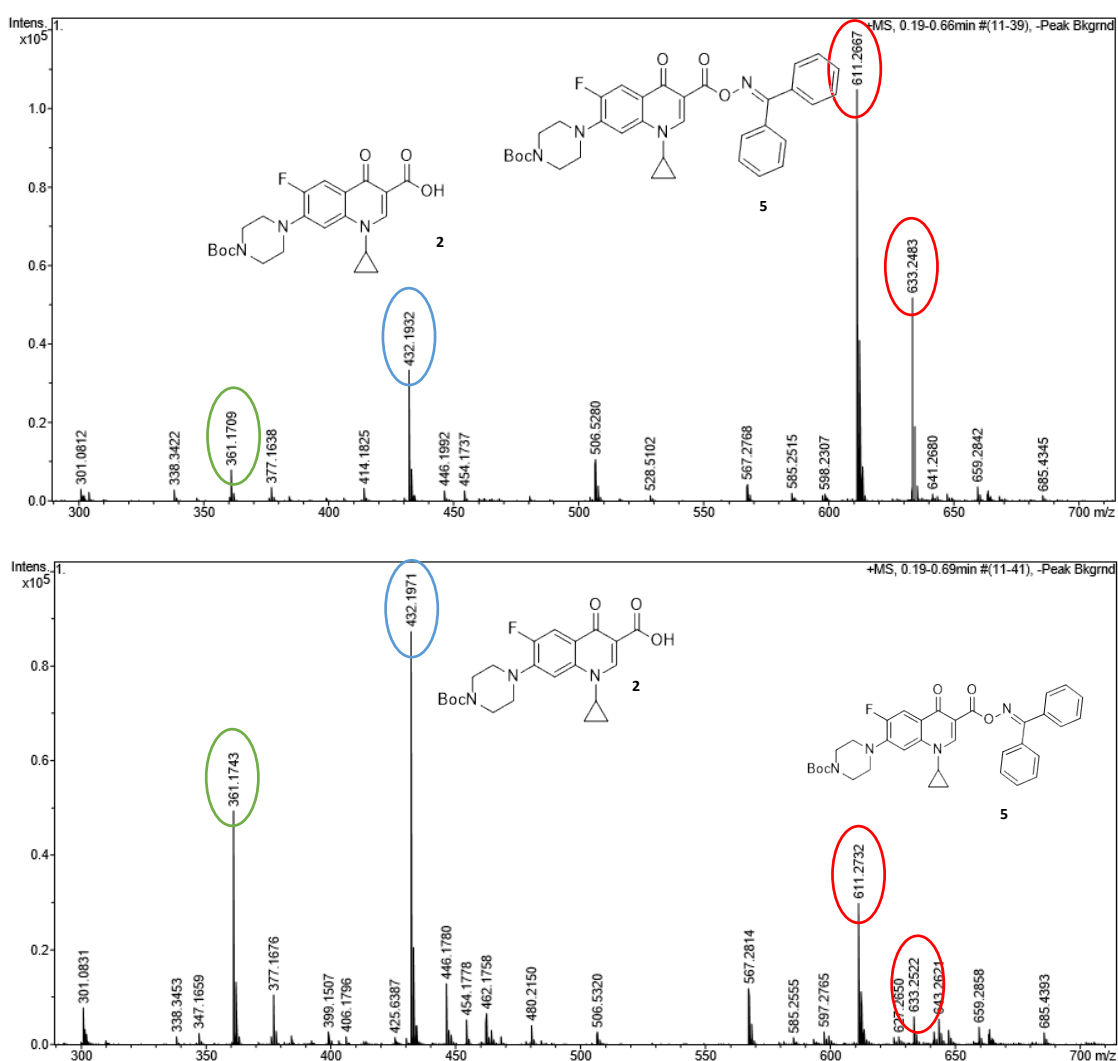


Figura 18. Espectroscopía de masas, a t_0 (A) y t_{90} (C) Tiempo en minutos. En rojo: compuesto **5**. En azul: compuesto **2**. Impureza a 361,17 en verde.

Se observa que la benzofenona es capaz de transferir la energía de excitación al compuesto **5**. Por tanto, la energía de triplete de **5** está comprendida entre 63,3 y 68,6 kcal/mol [Tabla 2] que se corresponden con las de la tioxantona y benzofenona respectivamente. La acetona, al tener una energía aún mayor, también funciona como sensibilizador para este caso, como ya se ha visto.

CAPÍTULO 5.

Conclusiones

En este trabajo, se han estudiado dos vías diferentes para la síntesis de moléculas con actividad antibiótica fotocontrolada a partir del ciprofloxacino. En la primera de ellas—síntesis de un interruptor molecular—la ruta sintética se vio interrumpida dada la nula reactividad mostrada frente una formilación aromática.

Sin embargo, en una segunda línea de trabajo relacionada con la fotoliberación de fármacos, se sintetizó un derivado que, al ser irradiado a longitudes de onda cercanas al visible es capaz de liberar el antibiótico.

Además, mediante el uso de fotosensibilizadores, se ha conseguido acotar la energía de excitación de triplete de dicho derivado, además de desplazar hacia el visible la longitud de onda necesaria para que se lleve a cabo la reacción.

Por último, se plantea la estructura para un posible subproducto formado en la reacción, que aunque no se realizan estudios suficientes para su completa caracterización, podría complementar futuras investigaciones.

CAPÍTULO 6.

Parte experimental

PARTE A. Modificación de la planicidad del ciprofloxacino.

Protección de amina.

Se colocan en un matraz 100 mg de ciprofloxacino junto con 1,1 equivalentes de Boc_2O . Se añade THF como disolvente y 2 equivalentes de NaOH disueltos en la mínima cantidad de agua posible. Si no se disuelve al cabo de un rato, añadir más NaOH. Se deja 24h con agitación a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente y se neutraliza el sólido con una disolución saturada de NH_4Cl . Se extrae 3 veces la fase acuosa con CH_2Cl_2 y se seca con sulfato de magnesio anhidro.

Protección de ácido.

Se añaden 100 mg de ciprofloxacino a un matraz de 25 mL y se disuelven en 0,4 mL de cloruro de tionilo. Tras 10 minutos de agitación se añaden 2 mL de MeOH. Se mantiene a reflujo de metanol hasta que la reacción haya acabado. Seguimiento mediante capa fina. Eluyente: (2:1) Metanol: acetato de etilo. Se evapora el disolvente y se añade éter etílico para favorecer la cristalización. Se evapora nuevamente y se observa una mayor cantidad de cristales.

Reacción de formilación de Vilsmeier-Hack

Se disuelven 50 mg de ciprofloxacino protegido en 6,5 equivalentes de DMF anhidra y 5 mL de *o*-diclorobenceno anhidro. La reacción se calienta a 100 °C y se añaden 2 equivalentes de POCl_3 gota a gota mediante embudo de adición durante 20 minutos y se deja en agitación 4h. Tras ese tiempo, se añade agua fría (500 mL) y se neutraliza con acetato de sodio diluido. Se deja a 0 °C durante 3h más y el precipitado se filtra y se lava con agua. Es necesario purificar en columna.

Reacción de formilación con cloruro de estaño (IV)

En 5 mL de tolueno seco, se mezclan 50 mg de ciprofloxacino protegido; 0,1 equivalentes de SnCl_4 y 0,4 equivalentes de Bu_3N y se agitan durante 20 minutos en atmósfera inerte. Posteriormente se añaden 0,6 equivalentes de paraformaldehído. Se añade la mínima cantidad de DMF anhidro como disolvente y se mantiene bajo atmósfera inerte, a reflujo y agitación durante 48 h.

También se prueba con un ácido de Lewis más reactivo, AlCl_3 , y CHCl_3 como disolvente.

PARTE B. Modificación del grupo ácido del ciprofloxacino.

Síntesis de 2.

Se corresponde con la protección del grupo amino, descrita anteriormente.

Síntesis de 3.

En un matraz de dos bocas, se disuelven 100 mg de ciprofloxacino protegido en 3 mL de CH_2Cl_2 , a los que se añaden 3 equivalentes de cloruro de oxalilo. La mezcla se mantiene 2h a reflujo con agitación. El producto no es muy estable y la reacción puede revertir, por lo que se recomienda hacer en el mismo día. Una vez transcurrido el tiempo, se evapora el disolvente.

Síntesis de 4.²⁸

Se disuelven 10 mmoles de benzofenona en 20 mL de etanol a 35 °C. Por otro lado, se disuelven 1,1 equivalentes (11 mmol) de acetato de sodio en 8mL de agua y se mezclan con otra disolución de 1,1 equivalentes de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en 11 mL de agua. Una vez mezcladas se añaden rápidamente a la disolución de benzofenona previamente preparada.

La mezcla resultante se mantiene 24h a reflujo (100 °C). Transcurrido ese tiempo se añade agua fría observándose un precipitado blanco cristalino. Tras 2h en frigorífico se filtra a vacío y se lava con agua. No es necesario purificar. El compuesto se debe guardar en congelador.

Síntesis de 5.

Una vez formados los compuestos **3** y **4** se disuelven 1,2 equivalentes de la oxima (**4**) en la mínima cantidad posible de piridina. Bajo atmósfera inerte, se disuelve el cloruro de ácido (**3**) en 2 mL de CH_2Cl_2 seco y se añade la oxima con la piridina.

Se mantiene unas 2h a reflujo y se sigue mediante capa fina. [Figura 19] Posteriormente se extrae dos veces con HCl 2M y NaHCO_3 . Se seca con sulfato de magnesio y se evapora el diclorometano restante.

Es necesario purificar en columna. El éster de oxima aparece entre de la oxima libre (que corre con el frente) y el ciprofloxacino libre (que queda más retenido) [Figura 19]. Eluyente utilizado, diclorometano : acetato de etilo (2:1)

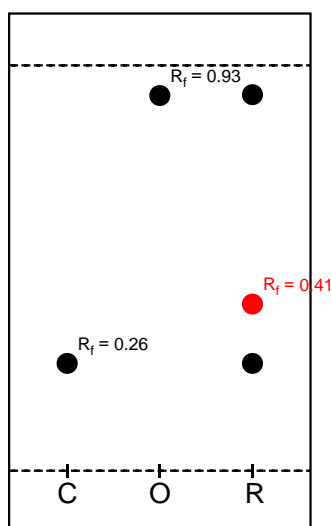


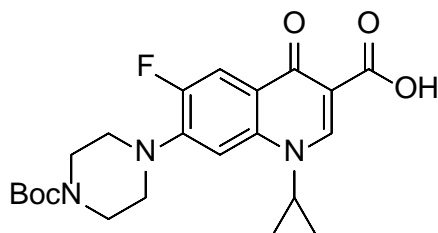
Figura 19. CCF de la reacción. C: patrón de ciprofloxacino (**1**). O: patrón de oxima. (**4**) R: reacción. En rojo, **5**.

²⁸ RUIZ, Rafael Alonso. *Irradiación de aciloximas y su participación en procesos de ciclación intramolecular*. 2008. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.

Caracterización de compuestos

Compuesto 2

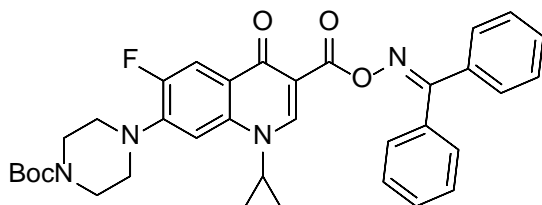
- Fórmula: $C_{22}H_{26}FN_3O_5$
- Masa exacta: 431,4644 uma
- Estructura:



^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm) 14.94 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 3.54 (dt, $J = 7.0, 3.3$ Hz, 1H), 3.29 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 1.49 (s, 9H), 1.34 – 1.11 (m, 4H).

Compuesto 5

- Fórmula: $C_{35}H_{35}FN_4O_5$
- Masa exacta: 610,6864 uma
- Estructura:



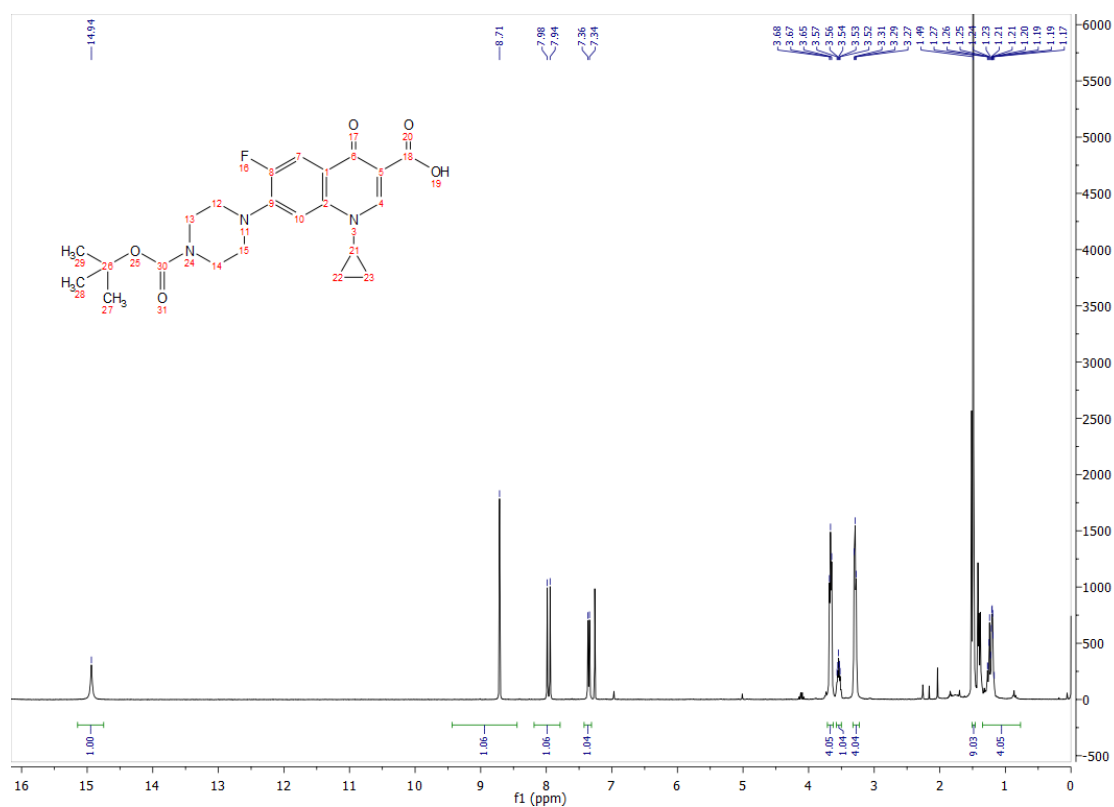
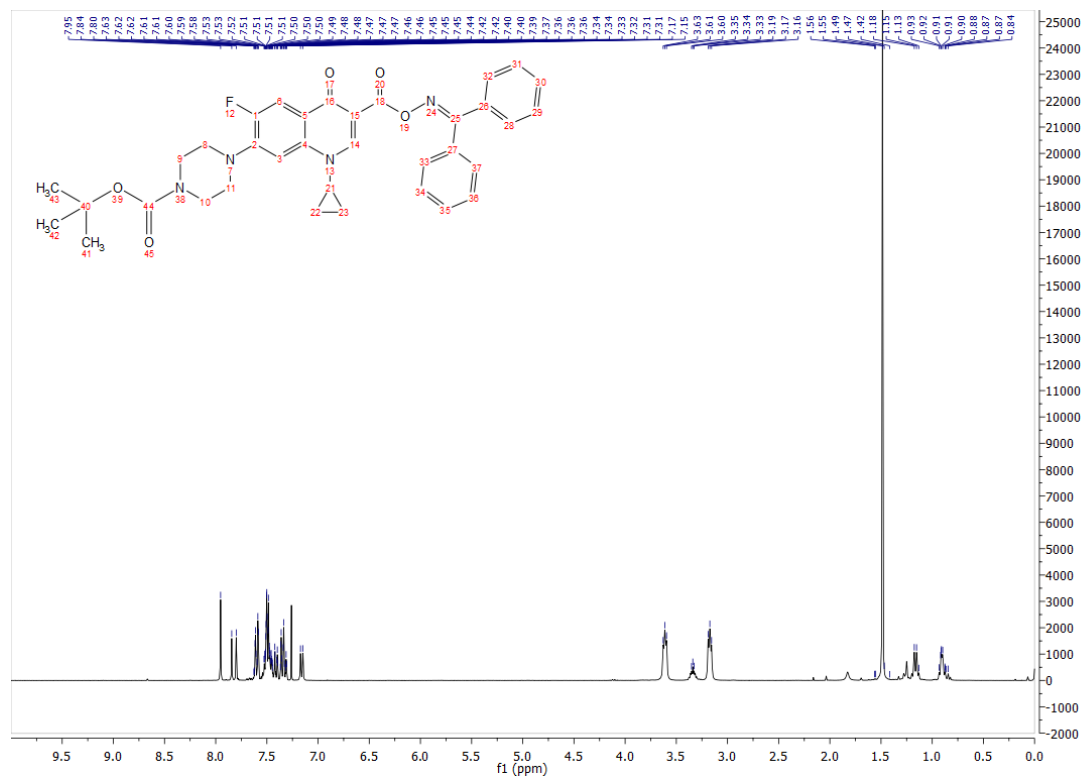
- Observaciones: Sólido blanco amarillento.

^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7.95 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 7.61 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 4H), 7.48 – 7.44 (m, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 2H), 7.16 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.61 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 3.34 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.23 – 3.08 (m, 4H), 1.49 (s, 9H), 1.20 – 0.81 (m, 4H).

^{13}C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*) δ 172.63 (d, $J = 2.2$ Hz), 164.46, 161.33, 154.72, 153.50 (d, $J = 251.5$ Hz), 147.72, 144.48 (d, $J = 10.5$ Hz), 137.80, 135.04, 133.19, 129.55, 128.40 (d, $J = 5.5$ Hz), 122.79 (d, $J = 6.9$ Hz), 113.07 (d, $J = 23.1$ Hz), 108.22, 105.32 (d, $J = 2.9$ Hz), 80.23, 49.97, 34.66, 28.55, 8.16.

UV-Vis (acetona): $\lambda_{\text{máx}}$: 336 nm ($\epsilon = 11676 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Anexos

^1H RMN (300 MHz, cloroformo-*d*) del compuesto 2. ^1H RMN (300 MHz, cloroformo-*d*) del compuesto 5.

^{13}C RMN (75 MHz, Cloroformo- d) del compuesto **5**.

